

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 77 02391

(54) Nouveaux copolymères hydrophiles à base de N-[tris (hydroxyméthyl) méthyl] acrylamide ou de N-[tris (hydroxyméthyl) méthyl] méthacrylamide, leur préparation et leur emploi dans les techniques de séparation.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). C 08 F 220/58; B 01 D 15/00; C 08 L 5/00, 33/26;
C 08 L 89/00.

(22) Date de dépôt 28 janvier 1977, à 14 h 24 mn.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande B.O.P.I. — «Listes» n. 34 du 25-8-1978.

(71) Déposant : MAR-PHA Société d'Etudes et d'Exploitation de Marques, résidant en France.

(72) Invention de : Eric Brown, Egisto Boschetti, Monique Corgier et Joël Touet.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire :

Deuxième demande divisionnaire déposée le 28 juillet 1977, n. 77.23223.

La présente invention a pour objet de nouveaux copolymères hydrophiles, leurs procédés de préparation et leur emploi, sous forme de gels aqueux, dans des techniques de séparation telles que la chromatographie en phase liquide sur gel.

5 La chromatographie en phase liquide sur gel est une méthode courante de fractionnement et séparation des molécules en fonction de leur taille. Les molécules de taille supérieure aux plus gros pores de gel se déplacent avec la phase mobile liquide, alors que les molécules de taille plus petite pénètrent
10 plus ou moins profondément dans les pores du gel, qui constitue la phase stationnaire, et sont donc plus ou moins retenues. Si donc on fait circuler sur une colonne remplie de gel une phase liquide dans laquelle on a injecté un échantillon contenant des molécules de tailles différentes, la vitesse de migration de ces
15 molécules vers le bas de la colonne variera d'une molécule à l'autre et les molécules seront donc séparées.

Les principaux hydrogels actuellement utilisés comme support dans les techniques mentionnées ci-dessus sont d'une part les gels de polysaccharides naturels éventuellement réticulés
20 (gels d'agarose, gels de dextran connus sous la marque commerciale Sephadex) et d'autre part des gels de polymères synthétiques ou semisynthétiques comme, par exemple, les gels de polyacrylamide ou les gels mixtes polyacrylamide - agarose. Ces supports ne sont pas exempts de défauts. Les gels de polyacrylamide ou polyacryla-
25 mide - agarose sont chimiquement instables en milieu basique du fait de l'hydrolyse des groupes amide en groupes acide carboxylique, ce qui limite leur domaine d'emploi. Certains gels de dextran présentent des propriétés mécaniques médiocres, d'où l'im-
possibilité d'en faire des colonnes ayant un débit relativement
30 élevé et constant. Enfin les gels d'agarose résistent mal à la chaleur et aux agents affaiblissant les liaisons hydrogène (urée, guanidine, etc...) et de plus, comme tous les gels d'origine naturelle, sont très sensibles à l'attaque par les bactéries ou certains enzymes.

35 A cause des défauts signalés ci-dessus, il a été

proposé de remplacer les gels précédents par des gels de copolymères hydrophiles de N-[tris (hydroxyméthyl) méthyl] méthacrylamide et de N,N'-éthylène-bis- méthacrylamide ou N,N'-méthylène-bis-acrylamide (agent réticulant) (cf Tetrahedron Letters No 6, p 357 - 358, 1975). Mais l'obtention de gels homogènes, donc transparents, de tels copolymères est difficile car, lors de la polymérisation, il se forme, spécialement aux fortes concentrations en agent réticulant, des homopolymères de N,N'-éthylène-bis- méthacrylamide ou N,N'-méthylène-bis-acrylamide, qui forment des précipités blancs au sein du gel.

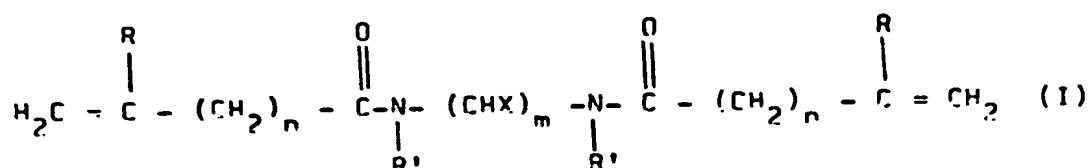
Or il a été trouvé, conformément à la présente invention, de nouveaux copolymères très hydrophiles qu'il est facile d'obtenir sous forme de gels aqueux homogènes et qui sont susceptibles de remplacer avantageusement, dans leurs applications, aussi bien les gels hautement réticulés tels que les gels de dextran que les gels macroréticulés tels que les gels d'agarose.

Les copolymères selon l'invention sont des copolymères statistiques réticulés tridimensionnels, insolubles dans l'eau, qui contiennent, sous forme copolymérisée :

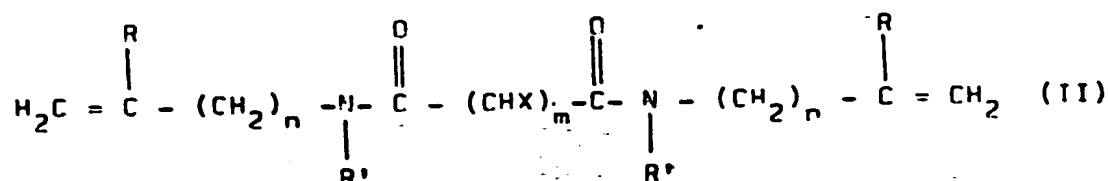
- a) 25 % à 98 % en poids de N-[tris (hydroxyméthyl) méthyl] acrylamide ou de N-[tris (hydroxyméthyl) méthyl] méthacrylamide, ou d'un mélange de ces deux composés.
- b) 2 % à 50 % en poids d'un ou plusieurs monomères possédant plusieurs doubles liaisons éthyléniques polymérisables et un ou plusieurs groupes hydroxy, et exempts de groupes NH_2 ou COOH ,
- c) 0 % à 50 % en poids d'un ou plusieurs monomères possédant une double liaison éthylénique polymérisable et un ou plusieurs groupes amino ou carboxylique.

Les monomères a) sont des produits connus. Ils ont été décrits, avec leurs procédés de préparation, dans diverses publications (cf, par exemple, JEDLIŃSKI et PAPROTNY, ROZNIKI Chemii, Ann. Soc. Chim. Polonorum, 1966, 40, p 1487 - 1491 ; Tetrahedron Letters No 6, 1975, p 357 - 358).

Les monomères b), qui sont des agents réticulants, répondent de préférence à l'une des formules générales (I) ou (II) ci-dessous :



5



10 dans lesquelles R est un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle. R' est un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyméthyle, X est un atome d'hydrogène ou un groupe CH, n et m sont des nombres entiers allant de 0 à 6, avec la restriction que X et R' ne peuvent être simultanément des atomes d'hydrogène.

15 Comme exemples de monomères b) on peut citer en particulier la N,N'-diallyl-tartradiamide, le glyoxal-bis-acrylamide, la N,N'méthylène-bishydroxyméthylacrylamide.

Comme exemples de composés c) on peut citer, entre autres, la N-[(N-acryloyl) glycy] glycine, la N-[(N-méthacryloyl) glycy] glycine, l'acide N-acryloyl-ε-aminocaproïque.

20 Bien que la présente invention concerne l'ensemble des copolymères ci-dessus définis, elle a plus particulièrement pour objet ceux de ces copolymères qui contiennent, sous forme copolymérisée, 50 % à 98 % en poids de monomères a), le complément à 100 % étant constitué par un ou plusieurs monomères b), et tout spécialement ceux qui contiennent 50 % à 98 % en poids de N-[(tris (hydroxyméthyl) méthyl] acrylamide, le complément à 100 % étant constitué par un ou plusieurs monomères b).

30 Les copolymères hydrophiles réticulés selon l'invention peuvent être préparés, selon des procédés connus, par polymérisation radicalaire des divers monomères en solution aqueuse. La polymérisation est effectuée à une température de 0°C à 100°C, de préférence 40°C à 60°C, et en présence des initiateurs habituellement utilisés en polymérisation radicalaire. Comme tels on peut citer, par exemple, les systèmes red-ox comme N,N,N,'N' tétraméthyl éthylènediamine (TEMED) + persulfate alcalin ou 35 diméthylaminopropionitrile + persulfate alcalin, les peroxydes

organiques comme le peroxyde de benzoyle, et l'azo-2,2'-bis-isobutyronitrile. La concentration totale en monomères [c'est-à-dire la concentration en monomères a) + b) + c)] des solutions aqueuses soumises à la polymérisation va de 20 g/l à 300 g/l et le pourcentage en poids de monomère b) dans les monomères totaux est de 2 % à 50 %.

La polymérisation peut être une polymérisation en bloc ou en émulsion. Dans le cas de la polymérisation en bloc, la solution aqueuse contenant les divers monomères et l'initiateur est soumise à une polymérisation en phase homogène. Le bloc de gel aqueux obtenu est ensuite fractionné en grains, par exemple par passage à travers les mailles d'un tamis.

La polymérisation en émulsion, qui est le mode de préparation préféré car elle fournit directement le gel aqueux sous forme de granules sphériques de taille déterminée, peut être effectuée comme suit :

La solution aqueuse contenant les divers monomères est versée lentement dans une phase liquide organique, non miscible à l'eau, maintenue en agitation et contenant éventuellement un agent émulsifiant. La vitesse d'agitation est réglée de façon à obtenir une émulsion de la phase aqueuse dans la phase organique ayant la taille de gouttelettes voulue. Le contrôle de cette taille, donc le réglage de l'agitation, est effectué par examen au microscope de prélèvements faits sur l'émulsion. Une fois réglée la vitesse d'agitation, on introduit dans l'émulsion l'initiateur, qui déclenche la polymérisation. Cette dernière est poursuivie jusqu'à son terme en conservant les mêmes conditions d'agitation. Les perles de gel aqueux ainsi obtenues sont lavées avec un solvant ou un tensio-actif afin de les débarrasser des traces de phase organique, puis avec de l'eau.

Comme phase organique liquide utilisable on peut citer, par exemple, les huiles végétales (huile de soja, huile d'arachide, huile de tournesol, etc..) ou minérales (huile de paraffine, huile de silicones), les produits de distillation fractionnée du pétrole (benzène, toluène, etc..) les hydrocarbures chlorés (tétrachlorure de carbone, chlorure de méthylène, etc..) et les mélanges de ces divers composés. La phase organique liquide peut

éventuellement contenir un agent émulsionnant comme les produits connus sous la dénomination commerciale "Spans" ou "Tweens", à la concentration de 0,1 % à 4 % en volume.

5 Les perles de gel aqueux obtenues par le procédé de polymérisation en émulsion ont un diamètre de particules qui varie, suivant les conditions opératoires, de 10 μ m à 600 μ m.

10 Les gels aqueux obtenus par l'un des procédés exposés ci-dessus peuvent être conservés en suspension dans de l'eau ou dans une solution tampon aqueuse, en présence de traces d'un bactériostatique comme, par exemple, l'azothydrate de sodium. Une concentration de 0,02 % en azothydrate de sodium suffit à assurer la conservation.

15 Les gels aqueux peuvent aussi être séchés par les procédés conventionnels (lyophilisation, traitement par un solvant organique miscible à l'eau, etc.). On obtient ainsi les copolymères sous forme d'une poudre blanche, réhydratable au moment de l'emploi. La réhydratation s'effectue par simple contact avec de l'eau ou une solution tampon aqueuse. Les poudres de copolymères représentent une forme très commode de stockage car
20 elles occupent un volume très faible et peuvent être conservées indéfiniment, sans addition de conservateurs et bactériostatiques.

Les copolymères selon l'invention sont stables thermiquement (ils résistent à des températures atteignant 120°C à 130°C) et insensibles à l'attaque bactérienne ou enzymatique.
25 En outre ils sont stables chimiquement en présence de solutions aqueuses nettement acides (pH 2) ou basique (pH 13), ce qui permet leur emploi dans un domaine de pH très étendu.

Les copolymères selon l'invention peuvent être utilisés avantageusement, à l'état de gels aqueux, comme supports
30 dans les techniques de chromatographie de perméation opérant en milieu aqueux ou en milieu mixte H_2O + solvant organique. Ils permettent de séparer, suivant leurs tailles, les composants des mélanges de substances macromoléculaires et notamment les composants des mélanges de protéines. Les propriétés des gels (rigidité, domaine de fractionnement) dépendent de la concentration
35 totale en monomères de la solution aqueuse soumise à la polymérisation, de la nature de l'agent réticulant (monomère b) et de

son pourcentage dans les monomères totaux, et aussi des conditions de polymérisation. En faisant varier ces divers paramètres on obtient toute une gamme de gels aux caractéristiques diverses. Ces gels permettent la séparation de macromolécules dont le poids moléculaire va de 500 daltons jusqu'à plusieurs millions de daltons.

Les copolymères selon l'invention peuvent être associés à des produits macromoléculaires naturels solubles dans l'eau et gélifiables, tels que, par exemple, l'agar-agar, l'agarose ou la gélatine, afin d'obtenir des gels mixtes ayant des caractéristiques particulières. Ainsi, pour avoir des gels particulièrement durs, on associera un copolymère selon l'invention à l'agarose. Dans ces gels mixtes le rapport en poids

produit macromoléculaire naturel gélifiable
copolymère selon l'invention

est ≤ 2 .

Pour préparer de tels gels mixtes on opère comme indiqué précédemment, sauf que l'on introduit au départ dans la solution aqueuse des monomères la quantité voulue de produit macromoléculaire naturel gélifiable, cette quantité correspondant à une concentration comprise en général entre 0,5 et 6 % en poids dans la solution aqueuse. Le produit macromoléculaire naturel se gélifie à l'intérieur des mailles du copolymère lorsqu'on refroidit le milieu réactionnel après la polymérisation.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans la limiter.

EXEMPLE 1 : Préparation d'un copolymère N-[tris(hydroxyméthyl)méthyl]acrylamide-N,N'-diallyl-tartradiamide sous forme de gel aqueux, par polymérisation en bloc.

Dans 100 ml d'eau déminéralisée, contenus dans un récipient placé au bain-marie à 50°C, on dissout 10 g de N-[tris(hydroxyméthyl)méthyl]acrylamide et 1 g de N,N'-diallyl-tartradiamide. La solution est ensuite filtrée, dégazéifiée sous vide et replacée au bain-marie à 50°C. La solution est agitée doucement à l'aide d'un agitateur magnétique et on y introduit 150 mg de persulfate d'ammonium et 0,16 ml de TENED. Au bout de quelques minutes on observe un léger échauffement du milieu réactionnel, suivi par la prise en masse de la solution. On obtient ainsi un bloc de gel aqueux rigide et transparent. Ce bloc est fragmenté en

Grains par passage sur un tamis ayant des mailles de 100 μ m.
Les grains sont lavés et conservés dans la solution tampon choisie.

Le gel homogène ainsi obtenu peut être utilisé
comme support en chromatographie de perméation. Son domaine de
fractionnement s'étend de 2500 daltons à 300.000 daltons.

EXEMPLES 2 à 4 :

On opère comme à l'exemple 1 mais en employant,
pour 100 ml d'eau déminéralisée, les quantités suivantes de
monomères :

	N-[tris (hydroxyméthyl) méthyl] acrylamide	N,N'-diallyl- tartradiamide
Exemple 2	5 g	1 g
" 3	10 g	0,5 g
" 4	20 g	1 g

On obtient des gels transparents homogènes, de
caractéristiques variées. Le gel de l'exemple 2 est peu compact,
celui de l'exemple 3 est compact et celui de l'exemple 4 est
très dur.

Ces gels sont utilisables comme support en chroma-
tographie de perméation. Les domaines de fractionnement des
gels des exemples 3 et 4 sont respectivement :

2500 daltons à 300.000 daltons (exemple 3)

1000 daltons à 100.000 daltons (" 4)

EXEMPLE 5 : Préparation d'un copolymère N-[tris (hydroxyméthyl)
méthyl]acrylamide / glyoxal-bis-acrylamide sous forme de perles de
gel aqueux.

Dans un réacteur de 700 ml, on introduit 350 ml
d'huile de paraffine et 2 ml de l'agent émulsifiant connu sous
la dénomination commerciale "Span-85". On agite mécaniquement
le mélange et le chauffe à 55°C. Par ailleurs on dissout, dans
200 ml d'eau chauffée à 55°C, 40 g de N-[tris(hydroxyméthyl)
méthyl]acrylamide et 4 g de glyoxal-bis-acrylamide et ajoute
à cette solution 300 mg de persulfate d'ammonium. La solution
ainsi obtenue est versée dans l'huile de paraffine agitée. La
vitesse d'agitation est réglée de façon à obtenir une émulsion

stable dont les gouttelettes ont un diamètre d'environ 100 μ m. Au bout de 10 minutes d'agitation, on introduit dans l'émulsion 0,32 ml de TEMED et on poursuit l'agitation pendant encore 30 minutes.

On refroidit alors le milieu réactionnel par addition d'eau glacée, arrête l'agitation et laisse reposer le mélange quelques heures. La phase huileuse surnageante est éliminée par succion et les perles de gel obtenues, d'un diamètre d'environ 100 μ m, sont récupérées par décantation. Ces perles sont lavées à l'aide d'une solution aqueuse de Triton X - 100 à 0,1 %, pour éliminer les restes d'huile, puis avec de l'eau déminéralisée jusqu'à élimination totale du détergent. Les perles peuvent être conservées dans l'eau ou dans une solution tampon appropriée.

Le gel aqueux transparent homogène ainsi obtenu est très dur. Il a un domaine de fractionnement qui s'étend de 1.500 à 50.000 daltons. Il est particulièrement indiqué pour les opérations de dessalage sur colonne des solutions de protéines.

EXEMPLES 6 à 8 :

On opère comme à l'exemple 5 mais en employant, pour 200 ml d'eau, les quantités suivantes de monomères :

	N-[tris(hydroxyméthyl)méthyl] acrylamide	glyoxal-bis- acrylamide
Exemple 6	10 g	1 g
" 7	30 g	2 g
" 8	40 g	2 g

On obtient des gels transparents homogènes, utilisables comme support en chromatographie de perméation. Le domaine de fractionnement du gel de l'exemple 7 est :

2500 dalton à 300.000 daltons.

EXEMPLE 9 :

Cet exemple est donné à titre comparatif.

Si, dans les exemples 1, 2, 5, 6 et 7 précédents, on

remplace la N,N'-diallyl-tartradiamide et le glyoxal-bis-acrylamide par la N,N'-méthylène-bis-acrylamide, on obtient des gels aqueux qui ne sont pas transparents, donc qui sont hétérogènes.

EXEMPLE 10 : Préparation d'un gel mixte contenant de l'agarose et un copolymère N- [tris(hydroxyméthyl)méthyl] acrylamide / glyoxal-bis-acrylamide.

On conduit la polymérisation comme à l'exemple 5, sauf que l'huile de paraffine est remplacée par l'huile de soja, que l'on emploie 7 ml de "Span 85" au lieu de 2 ml, et que la solution aqueuse versée dans l'huile contient, pour 200 ml d'eau, 10 g de N- [tris(hydroxyméthyl) méthyl] acrylamide, 3 g de glyoxal-bis- acrylamide, 4 g d'agarose et 300 mg de persulfate d'ammonium.

Une fois la polymérisation terminée on abaisse la température de l'émulsion progressivement jusqu'à 40°C puis refroidit brutalement l'émulsion par addition d'eau glacée. La phase huileuse surnageante est éliminée par succion et les perles de gel mixte obtenues sont séparées, lavées à l'aide d'une solution aqueuse à 0,2 % de laurylsulfate de sodium, puis avec de l'eau déminéralisée. Ces perles sont conservées en suspension dans de l'eau à 4°C contenant des traces d'un bactériostatique tel que l'azothydrate de sodium.

Le gel aqueux ainsi obtenu est particulièrement dur et convient très bien pour la chromatographie à débit élevé. Ce gel n'est pas thermostable et doit être utilisé à des températures inférieures à 17°C.

EXEMPLE 11 : Préparation d'un copolymère N- [tris(hydroxyméthyl) méthyl] acrylamide / glyoxal-bis-acrylamide sous forme sèche.

Les perles de gel aqueux obtenues dans les exemples 5 à 8 sont placées avec de l'eau dans un récipient pourvu à sa base d'une sortie à laquelle a été adapté un filtre. Les perles sont maintenues en suspension par agitation magnétique continue. On introduit de manière continue de l'alcool éthylique à la partie supérieure du récipient, le débit d'introduction étant réglé de manière à être ^{égal} au débit de sortie de l'eau à la base du récipient. Les perles en suspension vont donc se trouver en contact avec un milieu de plus en plus riche en éthanol. L'eau va être ainsi chassée progressivement de l'intérieur des perles et remplacée par

l'éthanol. Lorsque l'opération est achevée, on remplace à son tour l'éthanol par l'acétone, puis l'acétone par l'éther éthylique en suivant la même méthode. On obtient finalement un gel imbibé d'éther que l'on sèche sous courant d'air en quelques minutes.

- 5 On obtient ainsi, pour 100 ml de gel de départ, environ 5 à 20 g de copolymère, sous forme d'une poudre fine constituée de petites sphères. Cette poudre se réhydrate immédiatement par simple contact avec de l'eau et les particules reprennent leur forme initiale. Le comportement en chromatographie du gel séché et réhydraté ne diffère pas de celui du gel aqueux de départ.
- 10

REVENDICATIONS

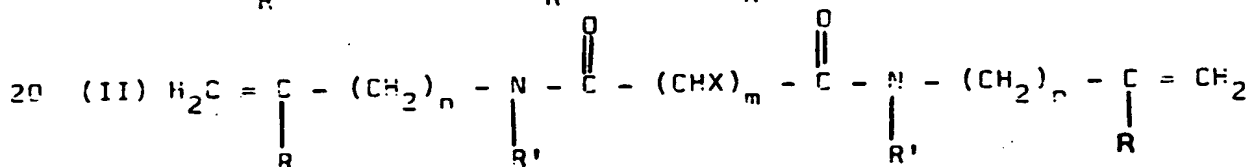
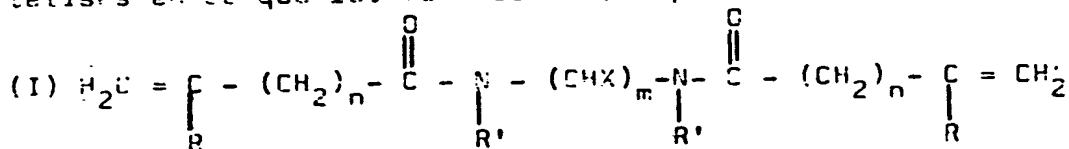
1°) Copolymères statistiques réticulés tridimensionnels, insolubles dans l'eau, caractérisés en ce qu'ils contiennent, sous forme copolymérisée :

5 a) 25 % à 98 % en poids de l'-[tris(hydroxyméthyl) méthyl] acrylamide ou de N-[tris(hydroxyméthyl) méthyl] méthacrylamide, ou d'un mélange de ces deux composés,

b) 2 % à 50 % en poids d'un ou plusieurs monomères possédant plusieurs doubles liaisons éthyléniques polymérisables et un ou plusieurs groupes hydroxy, et exempts de groupes NH_2 ou COOH ,

c) 0 % à 50 % en poids d'un ou plusieurs monomères possédant une double liaison éthylénique polymérisable et un ou plusieurs groupes amino ou carboxylique.

2°) Copolymères tels que définis dans la revendication 1) caractérisés en ce que les monomères b) répondent à l'une des formules :



dans lesquelles R est un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle, R' est un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyméthyle, X est un atome d'hydrogène ou un groupe OH, n et m sont des nombres entiers allant de 0 à 6, X et R' ne pouvant être simultanément des atomes d'hydrogène.

3°) Copolymères tels que définis dans chacune des revendications 1) ou 2) caractérisés en ce qu'ils contiennent, sous forme copolymérisée, 50 % à 98 % en poids de monomères a), le complément à 100 % étant constitué par un ou plusieurs monomères b).

4°) Copolymères tels que définis dans la revendication 3) caractérisés en ce que le monomère a) est la N-[tris(hydroxyméthyl) méthyl] acrylamide.

- 5°) Copolymères tels que définis dans chacune des revendications 3) ou 4) caractérisés en ce que le monomère b) est la N,N'-diallyl-tartradiamide.
- 6°) Copolymères tels que définis dans chacune des revendications 3) ou 4) caractérisés en ce que le monomère b) est le glyoxal-bis-acrylamide.
- 7°) Copolymères tels que définis dans chacune des revendications 3) ou 4) caractérisés en ce que le monomère b) est la N,N'-méthylène-bis-hydroxyméthylacrylamide.
- 8°) Gels aqueux caractérisés en ce qu'ils contiennent un copolymère tel que défini dans chacune des revendications 1 à 7)
- 9°) Gels aqueux tels que définis dans la revendications 8), caractérisés en ce qu'ils sont sous la forme de perles ayant un diamètre de 10 µm à 600 µm.
- 10°) Gels aqueux tels que définis dans chacune des revendications 8) et 9), caractérisés en ce qu'ils contiennent en plus un produit macromoléculaire naturel gélifiable, le rapport en poids produit macromoléculaire naturel gélifiable dans le gel étant copolymère inférieur ou égal à 2.
- 11°) Gels aqueux tels que définis dans la revendication 10), caractérisés en ce que le produit macromoléculaire naturel gélifiable est l'agarose, l'agar-agar ou la gélatine.